维普资讯 http://www.cqvip.com

81-86　　11809(1)

动 物 学 研 究 1994, 15 (3): 81—86　　CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

不同刺激对小鼠 B 细胞表面 IgD 表达的影响*

丛英姿　于士广
(山东大学生物系　济南　250100)

R392.12

A

摘要　本文通过细胞流式计(FACS)技术，利用单克隆抗体抗-IgD[Ig(5a)7.2]研究了膜表面IgD(sIgD)在新制备的小鼠 B 细胞上的表达。并通过用不同的丝裂原刺激脾脏休止 B 细胞，研究了不同刺激对 B 细胞 sIgD 表达的调节，发现脾脏 B 细胞形成两个主要细胞群，高浮力密度小 B 细胞高度表达 sIgD，而低度表达 sIgD 的细胞主要是低浮力密度大 B 细胞。无论用细菌脂多糖(LPS)或抗-IgM 和白细胞介素-6(IL-6)刺激脾脏休止 B 细胞，均可诱导表面 IgD 降低，同时细胞大量增殖，细胞个体增大，这些结果表明，无论体内或体外，B 细胞活化后表面 IgD 的表达降低。

关键词　sIgD，细菌脂多糖，抗-IgM，B 细胞　免疫球蛋白D，[illegible]，刺激

B 细胞的发育过程中，发生一系列的免疫球蛋白基因的重排(Livant 等，1986；Van Ness，1982)，包括免疫球蛋白重链(IgH)可变区和恒定区基因的重排。一旦前体细胞完成了 Ig 基因重排，并在其表面表达 Ig，就进入了休止状态，以对外界抗原发生应答或几天内死亡。在新生小鼠，大部分 B 细胞仅携带表面 IgM。从出生后 4 至 6 周起，大多数 B 细胞同时表达 IgM 和 IgD(Lawton 等，1974)。这两种细胞群之间发育上紧密相关。用抗-IgM 处理新生小鼠，发现 IgM⁻细胞是产生 IgG 和 IgA 的细胞的前体，但尚未确定这些前体细胞是否只表达 sIgM 或同时表达 sIgM、sIgD。抗-IgD 抗体无论在体内或在体外均可激活 B 细胞，使得它们对于刺激抗体生成的细胞因子具有更大的反应性，表明 sIgD 在 B 细胞的活化中具有重要的作用。

本文运用 FACS 技术研究了 IgD 在小鼠脾脏 B 细胞表面的表达。结果表明，所有脾脏 B 细胞都表达 sIgD，休止 B 细胞表面 IgD 的表达较高，B 细胞活化后 IgD 的表达降低。

1　材料和方法

1.1 动物

BALB／C 小鼠，常规饲养。

1.2 单克隆抗体

8C5 单克隆抗-CD3 由 Coffman R 博士(DNAX 研究所，Palo，Alto，CA)提供；

* 国家自然科学基金资助项目。部分实验在美国 Tufts 大学完成
本文 1994 年 1 月 3 日收到，同年 3 月 13 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

B7.6 anti-μ 由 Woodland R 博士(Massachusetts 大学医学中心，Worchester，MA)提供；rIL-6 由 Van Snick(布鲁塞尔)提供；RL172.4(anti-CD4)、TiB211 (anti-CD8)、anti-IgD [Ig(5a) 7.2]细胞株购自 ATCC (Rockville，MD)。上述抗体由本实验室用生物素或异硫氰酸荧光素(FITC)所标记。

1.3 细胞制备

脱颈杀死小鼠，取脾脏，制成单细胞悬液后，通过用 Tris-NH_4Cl 溶液(pH7.4)处理而去除红细胞。通过以补体介导抗体杀伤法，用抗-CD3、抗-CD4 和抗-CD8 抗体和兔补体处理而去除 T 细胞和粒细胞，制得 CD3-CD4-CD8-B 细胞。用 B7.6 抗-μ 染色，FACS 分析，B 细胞(μ^+)含量 > 97%。

将上述制备的细胞悬液放在由 50%、60%和 70% Percoll (Pharmacia，Sweden)组成的浮力密度梯度上，离心后分别收集 50%—60%界面之间的细胞和 60%—70%界面之间的细胞，即相应地得到低浮力密度 B 细胞和高浮力密度 B 细胞。

1.4 细胞培养

将 Percoll 浮力密度梯度离心制备的高密度小 B 细胞以 3×10^5 细胞／ml 的浓度培养在含有 5%小牛血清的 RPMI1640 中。5%CO_2、37℃培养，相应的实验组加入终浓度为 5 μg／ml LPS (S. Typhimurium；Sigma，St. Louis，MO)，不同时间收获细胞。

1.5 细胞增殖测定

^{3}H-胸腺嘧啶掺入法测定细胞增殖情况。将细胞培养在 96 孔培养板中，每孔 0.2 ml 细胞(2×10^5 细胞)，每组 3 个样品，收获前 6 h 加^{3}H-胸腺嘧啶，LKB β-计数器计数。

1.6 FACS 分析

新制备的细胞或收获的培养细胞，用 0.1%伊红排斥实验测定活细胞数。为了阻断 Fc 受体，染色前先向每个样品中加入经适当稀洗的 10 μl 单克隆抗体 2.4G2(抗-Fc 受体)，混合后短时间孵育，然后分别向每个样品中加入 50 μl 经适当稀洗的不同单抗，4℃孵育 30 min，洗两次，用 Becton Dickinson FACScan 流式细胞计进行分析(Cong 等，1991)，每个样品分析 10000 个活细胞。以未染色标本作为荧光标记抗体染色的阴性对照而确定分析的标准(marker)。FACS 结果为重复 3 次实验测定的结果。

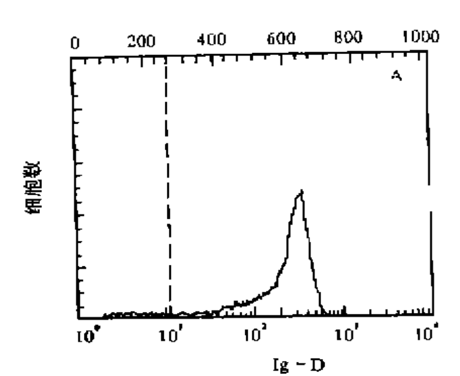
2 结果

2.1 sIgD 在脾脏 B 细胞表面的表达

先制备了 BALB／C 小鼠脾脏 CD3-CD4-CD8-B 细胞，单克隆抗体染色后，用 FACS 进行分析。所制备的细胞中，μ^+细胞为 97%，即 B 细胞占所制备细胞的 97%。$CD3^+$(T)细胞总是少于 2%。FITC 抗-IgD 染色后发现，绝大多数脾脏 B 细胞的表面表达 sIgD，为 $sIgD^+$。当我们用前向角散射(forward)和侧向散射(side scatter)将这些细胞分为小细胞群和大细胞群时，发现小 B 细胞群高度表达 sIgD，而大 B 细胞表面的 IgD 则较低(图 1)。也就是说，小 B 细胞表面 IgD 的表达较高，为 $sIgD^{high}$，大 B 细胞为 $sIgD^{low}$。

接着我们通过 Percoll 浮力密度梯度离心制备了高浮力密度细胞和低浮力密度细胞。对细胞表面 IgD 分子的分析表明，高浮力密度细胞高度表达 sIgD，而低浮力密度细胞表面 IgD 表达较低(图 2)。从上述结果可以看出，高浮力密度小 B 细胞高度表达 sIgD，为 $sIgD^{high}$，低浮力密度大 B 细胞表面 IgD 表达较低，为 IgD^{low}。

维普资讯 http://www.cqvip.com



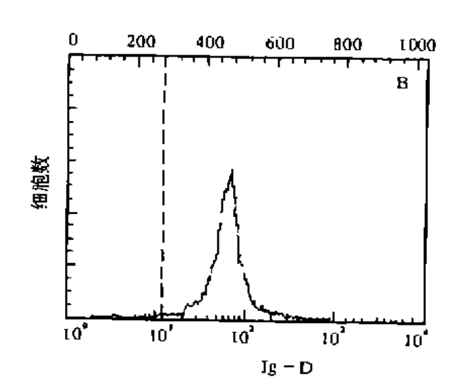
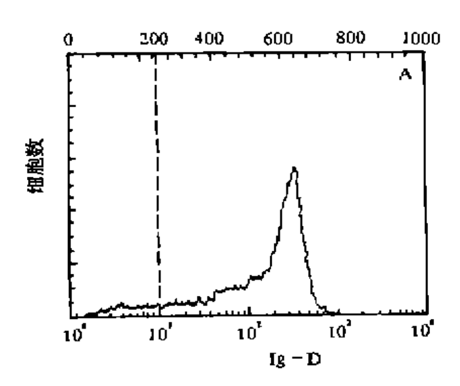


图 1　小鼠脾脏 B 细胞，FITC－抗－IgD 染色
Fig. 1　Splenic B cells stained by FITC－anti－IgD
A. 小 B 细胞　B. 大 B 细胞



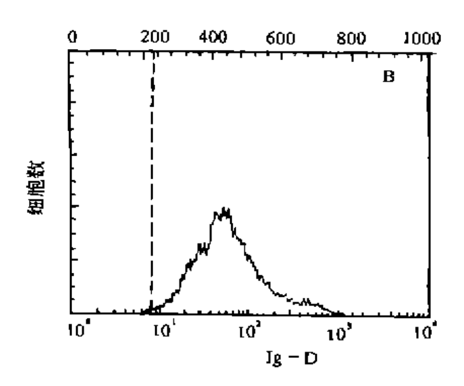


图 2　通过 Percoll 浮力密度梯度离心制备的小鼠脾脏高浮力密度 B 细胞(A)和低浮力密度 B 细胞(B)(FITC－抗－IgD 染色)
Fig. 2　Fresh splenic high－density B cells (A) and low－density B cells (B) prepared by percoll gradient and stained by FITC－anti－IgD

2.2 用 LPS 体外刺激脾脏休止 B 细胞可诱导细胞表面 IgD 表达的降低

LPS 是小鼠 B 细胞的有丝分裂原，可使其活化并进入增殖。我们用 5 μg／ml LPS 体外刺激小鼠脾脏休止 B 细胞，4 天后收获细胞，通过 Ficoll 密度梯度离心去除死细胞。FITC－抗－IgD 染色后，用 FACS 分析。同时通过^{3}H－胸腺嘧啶掺入法测定 B 细胞的增殖情况。结果表明，脾脏休止 B 细胞用 LPS 培养 4 天后，表面 IgD 分子的表达降低(图 3)，同时细胞个体增大。^{3}H－胸腺嘧啶掺入法测定表明，LPS 刺激后 B 细胞大量增殖。

2.3 用抗－IgM 单独刺激脾脏休止 B 细胞，表面 IgD 仍保持较高状态；抗－IgM 与 IL－6 共同刺激可诱导表面 IgD 表达的降低

为了进一步研究 B 细胞活化后表面 IgD 表达的变化，我们又先用抗－IgM 体外刺激

维普资讯 http://www.cqvip.com

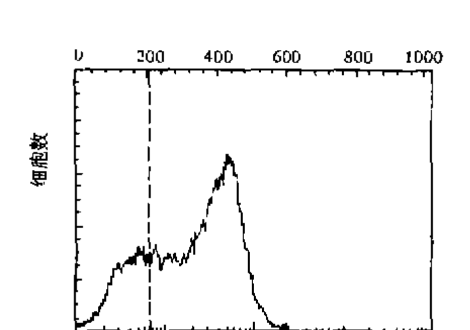
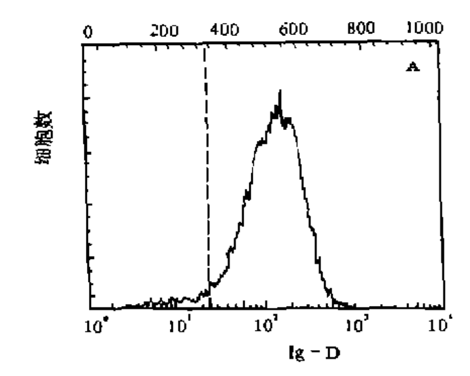


图3 用LPS体外刺激脾脏休止B细胞，4天后收获细胞。表面IgD表达降低

Fig. 3 Splenic cells stimulated with LPS for 4 days. The level of surface IgD decreases

脾脏休止B细胞。抗-IgM是一种膜交联剂，通过与B细胞表面IgM受体发生交联而激活B细胞。我们用抗-IgM体外刺激休止B细胞后，发现B细胞大量增殖，但细胞表面IgD仍处于较高状态。由于LPS能够诱导表面IgD表达的降低。因而我们认为可能需要另外的刺激因子与抗-IgM协同作用才可诱导这种变化。由于IL-6是B细胞分化的诱导者，并且T细胞和许多非T细胞都能产生IL-6(Van Snick，1990)。因而我们选用IL-6作为诱导表面IgD降低的共同的刺激因子。我们先用抗-IgM培养休止细胞，4天后加rIL-6(100 U／ml)，继续培养2天，结果发生了预期的变化，即表面IgD降低(图4)。另外，我们还发现IL-1、IL-2、IL-3单独或相互结合均不能协同抗-IgD诱导表面IgD的降低。



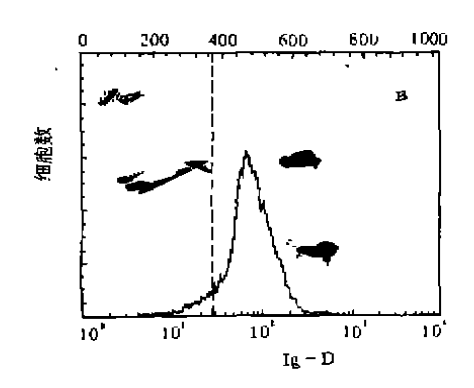


图4 脾脏休止B细胞用B7.6抗-IgM刺激4天后，再加rIL-6培养2天

Fig. 4 Staining of B cells after stimulation for 4 days with B7.6 anti-IgM and 2 additional days with anti-IgM alone

A. 无rIL-6；B 加rIL-6 (100 U／ml)

3 讨论

本文运用FACS技术研究了IgD分子在脾脏B细胞表面的表达以及B细胞表面IgD表达的调控，结果表明B细胞活化后细胞表面IgD降低。

抗-IgD抗体刺激可激活休止B细胞并诱导其DNA的合成，促进磷酸肌醇的转换(Kim等，1991)。小鼠体内注射抗-IgD抗体，7—9天后，可刺激强烈的多克隆IgG1反应。所注射抗-IgD抗体首先与B细胞上的表面IgD发生交联，刺激T细胞非依赖的细胞个体增大，MHCⅡ类抗原分子及其它活化相关的抗原的表达及其DNA的合成(Goroff

维普资讯 http://www.cqvip.com

等，1986)，表明表面 IgD 在 B 细胞的活化和增殖中起重要的作用。但 Rothstein 等(1986)发现抗-IgM 抗体可抑制 B 细胞的生长的分化，但抗-IgD 却不具上述功能，表明表面 IgD 和 IgM 功能之间的差异。我们的结果发现，小鼠脾脏 B 细胞可以分为两个主要细胞群，高密度小 B 细胞表面高度表达 IgD，而大部分低密度大 B 细胞表面 IgD 表达较低。以前的工作表明，高浮力密度小 B 细胞为休止 B 细胞，低浮力密度大 B 细胞为已活化的 B 细胞(Mond 等，1987)。因而我们的上述结果表明，在体内脾脏休止 B 细胞为表面 IgD^{high}，而活化的 B 细胞为 IgD^{low}，为了进一步证实上述结论，我们分别用 LPS 和抗-IgM 体外刺激 B 细胞，结果 LPS 可诱导表面 IgD 的丢失。随着 B 细胞的活化，其表型由表面 IgD^{high} 变为 IgD^{low}。而抗-IgM 单独并不能诱导 sIgD 的降低，只有用 IL-6 协同抗-IgM 刺激后 sIgD 才降低。LPS 和抗-IgM 刺激均诱导 B 细胞大量增殖、大量合成 DNA，细胞个体增大。上述结果直接证明 B 细胞在体外活化后表面 IgD 的表达降低。

由于不同刺激所引起的活化产生表面 IgD 表达程度的不同，这可能反映了不同刺激导致 B 细胞活化的内在机制的不同，表面 IgD 的量可能反映了不同的 B 细胞活化过程，由于 IL-6 可协同抗-IgM 诱导表面 IgD 的降低，因而不同的细胞因子在表面 IgD 表达的调控中可能起着重要的作用。

参考文献

Cong Yingzi *et al*. 1991. Treatment of murine CD5-B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Inter. Immunol.*, **3**: 467.

Finkelman F D *et al*. 1982. Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. I. Inerease in cell size and DNA synthesis. *J. Immunol.*, **129**: 629.

Goroff D K *et al*, 1991. Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. XI. contribution of membrane IgD crosslinking to the generation of an in vivo polyclonal antibody response. *J. Immunol.*, **146**: 18.

Goroff D K *et al*, 1986. *In vitro* and *in vivo* B lymphocyte activating properties of monoclonal anti-antibodies. *J. Immunol.*, **135**: 2381.

Kim K M *et al*, 1991. Growth regulation of a human mature B cell line, B104, by anti-IgM and anti-IgD antibodies. *J. Immunol.*, **10**: 232.

Livant K *et al*, 1991. One heavy chain variable region gene segment subfamily in the BALB/c mouse contains 500-100 or more members. *Cell.*, **47**: 461.

Lawton A R III, M D Cooper, 1974. Modification of B-lymphocyte differentiation by anti-immunoglobulins. *Contemp. Top. Immunobiol.*, **3**: 193.

Mond J J *et al*, 1987. B-lymphocyte activation mediated by anti-immunoglobulin antibody in the absence of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 8588.

Rothstein T L, 1986. Stimulation of B cells by sequential addition of anti-immunoglobulin antibody and cytochalasin. *J. Immunol.*, **136**: 813.

Van Ness, B *et al*. 1982. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin K light chain is frequently retained in cells that rearrange the K locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**: 262.

维普资讯 http://www.cqvip.com

VAn Snick J, 1990 Interleukin-6: An overeview. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**: 253.

REGULATION OF SURFACE IgD EXPRESSION ON MURINE B CELLS

Cong Yingzi Yu Shiguang

(Dept. of Biology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract

The expression of surface IgD on murine splenic B cells and the regulation of sIgD expression by different stimuli were studied in this paper. The results demonstrated that splenic B cells form two major populations. The high-density small splenic B cells have the phenotype of $sIgD^{high}$ and $sIgD^{low}$ B cells fall into low-density large population. Activation of resting B cells with LPS and anti-IgM induces differences in the level of IgD. Stimulation of resting B cells with LPS decreases the level of sIgD, but sIgD remains high after anti-IgM stimulation. Additional stimulation of rIL-6 following anti-IgM stimulation can lead to decrease the level of sIgD. Taking those together, we conclude that the expression of sIgD goes down following B cell activation.

Key words sIgD, LPS, anti-IgM, B cell